



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 195 15 891 A 1

⑯ Int. Cl. 8:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04

⑯ Aktenzeichen: 195 15 891.1
⑯ Anmeldetag: 29. 4. 95
⑯ Offenlegungstag: 31. 10. 95

DE 195 15 891 A 1

⑯ Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑯ Erfinder:

Rolfs, Arndt, Dr.med., 18055 Rostock, DE; Heldrich,
Björn, Dr., 10783 Berlin, DE; Robinson,
Peter-Nicholas, 10629 Berlin, DE; Tiecke, Frank,
Dipl.-Bio.-Chem., 13057 Berlin, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

US	52 98 392
US	48 10 644
WO	94 28 174 A1
WO	92 11 273 A1

HEIDRICH, B. et al.: Med. Microbiol. Lett. 3, (1994)
S. 279-290;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Gattungs- und speziespezifische Identifizierung von Legionellen

⑯ Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionellen und gattungsspezifische und speziespezifische Identifizierung.

DE 195 15 891 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09. 95 602 044/429

33/25

Beschreibung

5 Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella und Verfahren zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella sowie dafür geeigneter Reagenzien.

10 Legionellen sind aquatische, ubiquitäre gramnegative aerobe, fakultativ intrazelluläre stäbchenförmige Bakterien. Die Familie Legionellaceae besteht aus einer Gattung (Legionella) mit derzeit 48 bekannten Spezies und 51 Serogruppen. Von der wichtigsten Spezies *L. pneumophila* existieren 16 bekannte Serovare. Unter ihnen wichtigsten Reservoiren sind Wasserleitungen, Klimaanlagen und Kühltürme. Die Infektion des Menschen erfolgt über legionellenhaltige Aerosole. Die Legionellose tritt häufig als Epidemie, z. B. über Duschköpfe aus Warmwasseranlagen, kontaminiertes Kühlwasser in Klimaanlagen, oder sporadisch auf. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht beschrieben.

15 Legionellen-Infektionen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Legionärskrankheit, eine akute, schwere, oft mit hohem Fieber, abdominellen Beschwerden, Kopfschmerzen, Myalgien und Verwirrtheitszuständen und anderen neurologischen Symptomen einhergehende atypische Pneumonie sowie das Pontiac-Fieber, eine mit grippeähnlichen Symptomen verlaufende selbsslimitierende Variante der Legionellose.

20 Die wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila*, ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pn. Sero. 1*) als dem mit ca. 80% häufigsten Erreger der Legionärskrankheit. Es existieren aber große regionale Unterschiede, insbesondere bei den nosokomial erworbenen Legionellosen. Im Gegensatz dazu werden bei Pontiac-Fieber überwiegend *L. micdadei* und andere Non-*Pneumophila*-Spezies als kausales Agens beschrieben.

25 Die Labordiagnostik der Legionellen ist schwierig. Legionellen können nur schlecht mit Fuchsin angefärbt werden, so daß man die Erreger mit der Gram-Färbung praktisch nicht darstellen kann. Legionellen wachsen nicht auf üblichen Kulturmedien, sondern nur auf Spezialnährböden und einer Atmosphäre, die 2,5–5% CO₂ enthält. Die Sensitivität der Kultur ist nur ca. 20% für *L. pneumophila* und ca. 5% für andere Spezies.

30 Zum Nachweis von Legionellen wurden unter anderem DNS-DNS-Hybridisierungen, Pulsfeld-Elektrophorese, Ribotyping, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Fettsäure- und Uclibhion-Analysen, rRNS-Sequenzierung, RT-PCR und Southern Blot, Latex-Agglutination, Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie, indirekte Immunfluoreszenz und Kohlenhydratutilisation (BIOLOG-System) angewandt.

35 In Med. Microbiol. Lett. 1994; 3: 279–290 und Clin. Lab. 1993; 40: 211–216 ist die Sequenzierung von 5S-rDNS von Legionellen beschrieben.

40 Auf dem Markt ist ein Kit zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben erhältlich. Bei einem Nachweisverfahren mit Hilfe dieses Kits wird in einem ersten Schritt ein Fragment der 5S-rDNS genusspezifisch amplifiziert. In demselben Gefäß wird ein Fragment des MIP-Gens der Spezies *L. pneumophila* amplifiziert. Der Kit enthält insgesamt 7 Primer zur Durchführung einer sogenannten Multiplex-PCR unter Herstellung zweier PCR-Amplifikate. Anschließend erfolgt die Detektion der Amplifikate durch Reverse Dot Blot. Das in diesem Kit realisierte Verfahren ist wegen der Notwendigkeit des Einsatzes einer großen Anzahl von Primern komplex und in der Herstellung aufwendig. Darüber hinaus ist das bekannte Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität unbefriedigend.

45 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Reagenzien, die den Nachweis von Legionellen einfacher gestalten und die weniger Komponenten beinhalten. Eine weitere Aufgabe war es, spezifischere und potentiell variablene Legionellennachweise zur Verfügung zu stellen.

50 Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella, in dem mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung Legionella amplifiziert werden.

55 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nachweisverfahren unter Verwendung des oben genannten Amplifikationsverfahrens.

60 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID. NO. 1 ist oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 ist.

65 Kern der Erfindung ist, daß Sequenzen auf dem Legionella-Genom lokalisiert wurden, die das Entwerfen von Nukleinsäuresonden erlauben, die zum Nachweis aller bislang den Legionellen zugeordneten Spezies der Gattung Legionella verwendet werden können.

70 Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration der in einem Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleinsäuren oder Teilen davon verstanden. Beispiele für solche Amplifikationsverfahren sind die Polymeras-Kettenreaktion gemäß EP-B-0 201 184, das sogenannten NASBA-Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 sowie davon abgeleitete Verfahren.

75 Bei dem Verfahren der EP-A-0 201 184 wird die zu amplifizierenden Nukleinsäure, die einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurestrang komplementäres Verlängerungsprodukt des betreffenden Primers synthetisiert wird, und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrize zur Synthese eines Verlängerungsprodukts des anderen Primers dienen kann. Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, und Verwendung der gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungsposition der Primer liegt.

80 Bei dem Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 wird eine Primerkonstruktion zur Erzeugung einer doppelsträngi-

gen Nukleinsäure verwendet, in der die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz funktionell an einen Promotor gebunden ist. Hierzu weist einer der Primer mindestens einen Strang einer Promotorregion auf. Der intermedial gebildete Transkriptionskomplex wird Bedingungen unterworfen, unter denen unter der Kontrolle des Promotors Ribonukleinsäuren unter Verwendung der zu amplifizierenden Nukleinsäure als Matrize gebildet werden. Die gebildeten Ribonukleinsäuren werden erneut zur Bildung jeweils eines neuen transkribierbaren Nukleinsäurekomplexes verwendet. Ein Vorteil dieses Systems ist, daß es isotherm geführt werden kann.

Unter Multiplex-PCR wird ein Verfahren gemäß EP-A-0 364 255 verstanden. Nach diesem Verfahren werden in einer Eintopfreaktion durch geeignete Anordnung der Hybridisierungspositionen einer Vielzahl von Primern bestimmte Fragmente von Nukleinsäuren amplifiziert, die meist unterschiedliche Länge und Position im Genom aufweisen.

Bei dem erfundungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B. D. Hames und S. J. Higgins, IRL Press, 1986, insbesondere in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F. M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, insbesondere 2.9.1-2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, insbesondere 9.4.7-9.5.8, Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 329 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive (^{32}P), farbige oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate (rNTP oder dNTP) im allgemeinen besonders gut als Substrate von (RNS- bzw. DNS-)Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das hapenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des erfundungsgemäßen Amplifikations- und Nachweisverfahrens für Legionellen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäuren enthalten unter anderem auch die Gene, welche für ribosomale RNS (rRNS) codieren, sowie eine Reihe von Spacersequenzen. Diese werden nach der Größe der rRNS, für die sie codieren, benannt. In Legionellengenomen sind in dieser Reihenfolge das 16S-rRNS-Gen, das 23S-rRNS-Gen und das 5S-rRNS-Gen angeordnet. Diese Gene sind durch sogenannte Spacerregionen voneinander getrennt.

SEQ.ID.NO. 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die Ähnlichkeiten mit der in Spezies der Gattung *Legionella* enthaltenen genomischen Sequenz aufweist, die aneinander angrenzende Bereiche der 23S-rRNS, der Spacerregion zwischen 5S-rRNS- und 23S-rRNS- und des 5S-rRNS-Bereiches einschließt. Die SEQ.ID.NO. 1 schließt nur einen relativ kleinen Teil der 23S-rRNS jedoch die vollständige Spacerregion und ca. 80% der 5S-rRNS ein.

SEQ.ID.NO. 1 stellt eine Nukleotidsequenz dar, aus welcher Teilsequenzen entnommen werden können, die gattungsspezifisch für *Legionella* sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Nukleinsäuresonde nicht im Hinblick auf die Funktion einschränkend betrachtet werden. Die oben genannten Eigenschaften sind maßgebend. Insbesondere sollen zu den Nukleinsäuresonden auch die sogenannten Probes oder Nachweissonden gezählt werden, deren Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Legionellarnukleinsäuren als Maß für die Anwesenheit des Bakteriums nachgewiesen werden kann. Dazu kann die Nukleinsäuresonde bevorzugt weitere Teile enthalten, die den Nachweis oder die Amplifikation nicht wesentlich nachteilig beeinflussen. Zu solchen Molekülteilen gehören beispielsweise Markierungen zum Nachweis der Sonden, bzw. Hybriden, die diese Sonde enthalten, Gruppen, welche eine Immobilisierung der Nukleinsäuresonde an eine feste Phase erlauben, feste Phasen als solche (z. B. Beads oder Oberflächen, z. B. von Reagenz- oder Detektionsgefäß) oder weitere, nicht mit *Legionella*-Sequenzen interferierende Nukleotidsequenzen. Die Ausgestaltung der Nukleinsäuresonde richtet sich daher insbesondere nach der Art, wie der Nachweis der *Legionella*-Nukleinsäuren geführt werden soll.

Unter einer Nukleinsäuresonde wird ein Molekül mit einer festgelegten Aufeinanderfolge von Basen verstanden, welches in der Lage ist, mit natürlichen Nukleinsäuren Hybride aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen zu bilden. Hierzu gehören natürliche und artifizielle Nukleinsäuren. Die artifiziellen Nukleinsäuren unterscheiden sich von den natürlichen Nukleinsäuren dadurch, daß sie entweder im Basenteil (z. B. durch Verwendung von Basenanaloga, z. B. 7-deaza-dGTP) oder im Grundgerüst (Ersatz der Zucker- oder/und Phosphatgruppen durch andere chemische Molekülteile, z. B. Peptide) modifiziert sind. Derartige künstliche Nukleinsäuren sind beispielsweise auch die in WO 92/20702 beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNA). Wesentlich für die korrekte Funktionsweise der Nukleinsäuresonden ist die spezifische Basenpaarung, wodurch die Selektivität der Sonden erreicht wird. Besonders bevorzugt besteht eine Nukleinsäuresonde aus Desoxyribonukleinsäure

(DNS).

Unter einer Nukleinsäuresonde werden auch die sogenannten Primer verstanden, welche nach Hybridisierung mit Legionella-Nukleinsäuren unter Verwendung eines Enzyms verlängert werden können. Typische Verlängerungsreaktionen sind beispielsweise die Anhägung von Mononukleosidtriphosphateinheiten durch DNS-Polymerasen (z. B. E. coli DNS-Polymerase, Klenow-Fragment oder *Thermus aquaticus*-Polymerase) unter Verwendung der Legionella-Nukleinsäuren als Matrize. In diesem Fall wird mit den bislang bekannten Enzymen das 3'-Ende des Primers verlängert. Eine weitere Verlängerungsreaktion ist die Ligase-Reaktion, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem weiteren Oligonukleotid enzymatisch verknüpft wird (z. B. EP-A-0 320 308). Zwischen der Polymerase- und der Ligasereaktion sind Mischformen bekannt (z. B. WO 90/01069).

Unter einer für Legionella gattungsspezifischen Nukleinsäuresonde wird eine Nukleinsäure verstanden, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ.ID.NO. 1 bzw. deren Komplement enthält, oder die mit allen der in Tabelle 1 genannten Legionellspezies unter denselben Stringensbedingungen hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisieren diese Nukleinsäuren mit allen möglichen Spezies der Gattung Legionella.

Die gattungsspezifischen Sequenzen liegen bei der Sequenz der Fig. I bevorzugt im 23S- oder/und 5S-Bereich; wenngleich es bei geschickter Wahl der Hybridisierungsbedingungen auch möglich ist, gattungsspezifische Sonden auch im Spacer-Bereich zu entwerfen.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Erwartete Amplifikationslängen 23S-5S-Spacer-Region bei Verwendung von Primerpaar B/D

Species/ Serogroup	ATCC No. (NCTC)	Stamm	Amplifikations-/ komplett bestimme Länge der Sequenz	EMBL Accession Number	SEQ ID. NO.
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33152	Philadelphia-1	232bp/336bp	Z30431	26
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33153	Knoxville-1	232bp/336bp	Z30432	27
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43108	Benidorm 030E	232bp/336bp	Z30433	28
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43112	France 5811	232bp/336bp	Z30534	29
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43109	OLDA	232bp/336bp	Z30434	30
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43110	Oxford 4032E	231bp/335bp	Z30435	31
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43113	Camperdown-1	232bp/336bp	Z30435	32
<i>L. pneumophila</i> sero 2	33154	Togus-1	232bp/336bp	Z30437	33
<i>L. pneumophila</i> sero 3	33155	Bloomington-2	232bp/336bp	Z30438	34
<i>L. pneumophila</i> sero 4	33156	Los Anakes-1	232bp/336bp	Z30439	35
<i>L. pneumophila</i> sero 4	n.a.	Portland	232bp/336bp	Z30440	36
<i>L. pneumophila</i> sero 5	33216	Dallas-1B	232bp/336bp	Z30441	37
<i>L. pneumophila</i> sero 5	(11417)	Cambridges-2	232bp/336bp	Z30442	38
<i>L. pneumophila</i> sero 6	33215	Chicago-2	232bp/336bp	Z30443	39
<i>L. pneumophila</i> sero 7	33823	Chicago-8	232bp/336bp	Z30444	40
<i>L. pneumophila</i> sero 8	35096	Concord-3	232bp/336bp	Z30445	41
<i>L. pneumophila</i> sero 9	35289	IN-23-G1-C2	232bp/336bp	Z30446	42
<i>L. pneumophila</i> sero 10	43283	Leiden-1	232bp/336bp	Z30447	43
<i>L. pneumophila</i> sero 11	43130	797-PA-H	232bp/336bp	Z30448	44
<i>L. pneumophila</i> sero 12	43290	570-CO-H	232bp/336bp	Z30449	45
<i>L. pneumophila</i> sero 13	43736	82 A 3105	232bp/336bp	Z30450	46
<i>L. pneumophila</i> sero 14	43073	1169-MN-H	232bp/336bp	Z30451	47
<i>L. anisa</i>	35292	WA-316-C3	267bp/371bp	Z30535	48
<i>L. bromensis</i>	n.a.	n.a.	246bp/350bp	Z30536	49
<i>L. cherrill</i>	35252	ORW	258bp/362bp	Z30537	50
<i>L. cincinnatiensis</i>	43753	72-OH-H	213bp/317bp	Z30452	51
<i>L. dumoffii</i>	33279	NY-23	255bp/359bp	Z30538	52
<i>L. erythra</i>	35303	SE-32A-C8	201bp/325bp	Z30453	53
<i>L. feeleii</i> sero 1	35072	WO-44C	238bp/342bp	Z30454	54
<i>L. feeleii</i> sero 2	35849	691-WI-H	238bp/342bp	Z30455	55
<i>L. israelensis</i>	43119	Bercovier-4	217bp/321bp	Z30533	56
<i>L. jordanis</i>	33623	BL-540	244bp/348bp	Z30539	57
<i>L. longbeachae</i> sero 1	33462	Long Beach-4	208bp/312bp	Z30456	58
<i>L. longbeachae</i> sero 2	33484	Tucker-1	208bp/312bp	Z30465	59
<i>L. maceachrenii</i>	35300	PX-1-G2-E2	250bp/352bp	Z30461	60
<i>L. miedodeli</i>	33218	Tatlock	267bp/371bp	Z30460	61
<i>L. moravica</i>	n.a.	316-36	236bp/340bp	Z30457	62
<i>L. cakridigenis</i>	33761	OR-10	197bp/302bp	Z30540	63
<i>L. ruhrinocens</i>	35304	WA-270A-C2	219bp/324bp	Z30458	64
<i>L. saintheliensis</i>	35248	Mt St Helens-4	212bp/316bp	Z30459	65
<i>L. spiritensis</i>	35249	Mt St Helens-9	246bp/350bp	Z30464	66
<i>L. steigerwaltii</i>	35302	SC-18-C9	256bp/360bp	Z30463	67
<i>L. wadsworthii</i>	33877	81-716A	262bp/366bp	Z30462	68

Unter speziesspezifischen Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuren verstanden, die mit allen Serovaren einer Legionellaspezies unter denselben Stringensbedingungen hybridisieren. Solche Sonden sind mit ihrer Sequenz in Beispiel 3 wiedergegeben. Darunter befindet sich auch eine *L. pneumophila*-Speziessonde, die mit allen Serovaren der Spezies *pneumophila*, nicht jedoch mit den übrigen, in Tabelle 1 genannten, Spezies aus der Gattung *Legionella* hybridisiert.

Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind mindestens 15 Basen lang, besonders bevorzugt zwischen 23 und 40 Basen. Es handelt sich somit um Nukleinsäuren, welche auf einfache Weise durch chemische Synthese in sogenannten (Nukleinsäure-)Synthesizern hergestellt werden können. Sequenzen, die als gattungsspezifische Sequenz für *Legionella* zu gebrauchen sind, erhält man durch Aussuchen einer mindestens 15 Basen langen Sequenz aus SEQ.ID.NO. 1, wobei eine Abweichung in 1 oder 2 Basen der Gattungsspezifität in Abhängigkeit von den Hybridisierungsbedingungen in den meisten Fällen keinen Abbruch tun wird. Es ist selbstver-

ständlich, daß die Anzahl der Abweichungen mit zunehmender Größe der Nukleinsäuresonde zunehmen kann. Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 sind oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 sind. Besonders bevorzugt sind Sonden, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz (in direkter Aneinanderfolge) enthalten, die streng homolog oder streng komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 ist.

Die Gattungsspezifität könnte leiden, wenn die Sonde weitere Legionella-spezifische Sequenzen oder nicht-Legionella-spezifische Sequenzen enthält, die eine zu spezifische bzw. zu unspezifische Hybridisierung bewirken würden. Bevorzugt sind weitere Legionella-spezifischen Sequenzen, sofern sie überhaupt vorliegen, nicht mehr als 15 Basen lang.

Des weiteren kann eine Nukleinsäuresonde im Legionella-unspezifischen Teil funktionelle Nukleotidsequenzen, wie sie beispielsweise für Promotoren oder Origins of Replication charakteristisch sind, enthalten.

Innerhalb der SEQ.ID.NO. 1 sind bestimmte Bereiche zur Auswahl von gattungsspezifischen Sequenzen insbesondere für Nachweissonden besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Bereiche liegen zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 sowie 307 und 286. Besonders bevorzugt schließt die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 268 bis 296 ein.

Das erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren kommt im Gegensatz zum Stand der Technik mit weniger als 7 Primern aus. Dies ist beispielsweise möglich dadurch, daß als Primer eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden benutzt werden. Ein Amplifikationsverfahren, welches mit nur einem Primer auskommt, wird schon dadurch realisiert, daß der Primer mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert, mit Mononukleosidtriphosphaten unter Einwirkung einer DNS-Polymerase verlängert wird, das Verlängerungsprodukt von der Matrizen Nukleinsäure getrennt und der obige Vorgang mit einem neuen Primer wiederholt wird. In jedem Zyklus wird daher pro Nukleinsäure ein Verlängerungsprodukt gebildet. Es handelt sich somit um ein lineares Amplifikationsverfahren. Exponentielle Amplifikation ist theoretisch beispielsweise dann erreichbar, wenn 2 Primer eingesetzt werden, welche die prinzipiellen Bedingungen, wie sie in der EP-A-0 201 184 beschrieben sind, erfüllen. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein weiteres Primerpaar eingesetzt, welches auf dem amplifizierten Nukleinsäurefragment zwischen den Hybridisierungspositionen des ersten Primerpaars hybridisiert. Diese Ausführungsform wird gelegentlich auch als "nested PCR" bezeichnet. Darin werden insgesamt 4 verschiedene Primer eingesetzt.

Auch bei den auf Transkriptionsreaktionen beruhenden Amplifikationsverfahren werden im allgemeinen Fall 2 Nukleinsäuresonden eingesetzt, die entweder auf gegenüberliegenden Strängen oder auf einem Strang der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert werden können.

Erfindungsgemäß handelt es sich für das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren bei allen als Primer fungierenden Nukleinsäuresonden um Legionella-gattungsspezifische Sonden. In einem besonders bevorzugten Fall hybridisiert einer der Primer mit einem Strang der Legionella-Nukleinsäure in der 23S-rDNS-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-rDNS-Region. Dadurch wird erreicht, daß das amplifizierte Teilstück der Nukleinsäuresequenz der Legionellen sowohl Teile der 23S-rDNS-Region, der 5S-rDNS-Region als auch der dazwischenliegenden Spacerregion umfaßt. Zum Verständnis muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß sich die Amplifikate unterschiedlicher Spezies in der Sequenz unterscheiden, der zwischen den einander zugewandten Enden der ursprünglichen Primer liegt. Dabei handelt es sich eben bevorzugt um Sequenzen der Spacer-Region.

Das erfindungsgemäße gattungsgemäße Amplifikationsverfahren kann für mehrere Zwecke benutzt werden. In einer ersten Möglichkeit (z. B. im Sinne eines Screenings) kann die Summe aller in der Probe vorliegenden Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise möglich, wenn die in der gattungsspezifischen Amplifikation erzeugten Amplifikate mit einer weiteren gattungsspezifischen (gewünschtenfalls nachweisbar markierten) Nukleinsäuresonde zur Hybridisierung gebracht und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden. Dabei kann die Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) so gewählt werden, daß sie in den Bereichen nahe den ursprünglichen Primerhybridisierungsstellen hybridisiert, jedoch wird die Aussagekraft des gattungsspezifischen Nachweises dadurch noch erhöht, daß die Nukleinsäuresonde in dem zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer liegenden Bereich der Amplifikate hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisiert die gattungsspezifische Nachweissonde zwischen den Positionen 242 und 299 von SEQ.ID.NO. 1 und ist zwischen 25 und 35 Nukleotiden, besonders bevorzugt 26 bis 30 Nukleotiden lang. Mit der Veränderung der Länge der Sonde muß die Hybridisierungstemperatur entsprechend angepaßt werden. Die optimale gattungsspezifische Sonde hybridisiert zwischen den Positionen 268 und 296 und ist somit 29 Nukleotide lang.

Prinzipiell sind für den Nachweis der Amplifikate alle bekannten Nachweisformate verwendbar, beispielsweise Auf trennung nach Größe der Amplifikate (z. B. Gelektrophorese) aber auch die Blot-Verfahren. Beispielsweise kann schon aufgrund der Größenvariabilitäten der Spacer-Region eine Differenzierung von Non-Pneumophila-Spezies im einfachen, hochauflösenden Agarosegel durchgeführt werden, was im Sinne eines Screeningverfahrens eine rasche orientierende Information liefert. Auf einen Nachweis, der auf einem Hybridisierungsschritt mit einer Nachweissonde beruht, kann jedoch meist nicht verzichtet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung des Reverse-Dot-Blot-Formats erwiesen. Hierzu wird beispielsweise eine gattungsspezifische Nukleinsäuresonde auf einer Membran immobilisiert und anschließend das Produkt der Amplifikationsreaktion auf die immobilisierten Sonden gegeben. Dazu müssen die Amplifikate gegebenenfalls vorher einzelnsträngig gemacht werden. Wenn während der Amplifikation markierte Mononukleosidtriphosphate eingebaut wurden, ist der Nachweis der über die Nukleinsäuresonde immobilisierten Amplifikate nach Abwaschen nicht gebundener Nukleinsäuren auf einfache Weise möglich. Ein solches Format ist beispielsweise in der EP-A-0 237 362 beschrieben. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Ein Nachweis ist jedoch auch über die sogenannten Sandwich-Verfahren möglich, bei denen neben der

immobilisierten Nukleinsäuresonde eine weitere, markierte gattungsspezifische Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) eingesetzt wird, die mit den Amplifikaten an einer anderen Position hybridisiert als die Festphasen-gebundene Sonde. Dieses Verfahren ist prinzipiell in EP-B-0 079 139 beschrieben.

Das erfundungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren ermöglicht jedoch auch den verlässlichen und unkomplizierten Nachweis Legionella-Spezies (z. B. für den klinischen Routinealltag) oder Gemischen von Spezies (z. B. eine Unterscheidung von L-pneumophila von non-pneumophila). Für diesen Fall kann im Anschluß an das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren eine Hybridisierung mit einer (gewünschtenfalls markierten) speziespezifischen Sonde (Nachweissonde) durchgeführt werden, die im amplifizierten Bereich zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer hybridisiert. In SEQ.ID-Nos. 26–68 sind Sequenzen, aus welchen die speziespezifischen Sequenzen ausgewählt werden können, für einzelne Spezies angegeben. Die speziespezifischen Teile befinden sich insbesondere im Spacer-Bereich, der bevorzugt mittels der gattungsspezifischen Primer amplifiziert wird. Die Lage der Amplifikate (z. B. wie in Tabelle 1 angegeben) ergibt sich aus den Hybridisierungspositionen der Primer (in Tabelle 1 ist dies das Primerpaar B/D). Besonders bevorzugte speziespezifische Nachweissonden sind in Beispiel 3.7 angegeben.

Speziespezifische Nachweissonden, die auf diesen Spacersequenzen beruhen, sind bevorzugt länger als 15 bp und kleiner als die gesamte Spacerregion. 15

Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht daher den multiplen Nachweis von Legionella-Spezies unter Verwendung einer einzigen in einer vorgeschalteten gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion hergestellten Reaktionsmischung, die Amplifikate von Teilen der in der Probe anwesenden Legionella-Spezies enthält. Ein Vorteil der Erfindung ist daher, daß sie einen einfacheren, d. h. weniger komplexen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionelle ermöglicht. 20

Ebenfalls Gegenstand ist daher ein Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren, von denen einer mit einem Strang der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert. 25

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure, enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-rDNS und 23S-rDNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-rDNS und 23S-rDNS, die ein Genom direkt an die Spacerregion anschließen. Bevorzugt ist diese doppelsträngige Nukleinsäure höchstens 371 bp lang und ist das Produkt einer gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion. 30

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und mindestens eine Legionella-speziespezifische Sonde. 35

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

Bakteriengewinnung und Anzucht

Die hier verwendeten Legionellen "Type strains" wurden auf gepuffertem Hefe-Kohle-Extraktagar (P. H. Edelstein, Laboratory Diagnosis of infections caused by legionellae, Eur. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, 1, 4–10 (1987)) unter Zusatz von α -Ketoglutarat bei einer Inkubationstemperatur von 35°C in feuchter CO₂-Atmosphäre für mindestens 3 Tage angezüchtet. Gram-Färbungen, Mikroskopie und Inkubation von Blut-Agar-Platten zeigten kein Wachstum anderer Bakterien. Die Legionellen wurden mit 3 ml bidestilliertem Wassers von den Platten geerntet und verdünnt, mit 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μ l bidestilliertem Wasser resuspendiert. Logarithmische Verdünnungsreihen und Auszählen der Kolonien auf Agarplatten ergaben durchschnittlich 10¹⁰ KBE/ml. 40 45

Beispiel 2

DNS-Aufschluß

Je ein 250 μ l-Aliquot der jeweiligen Bakterienkultur wurde zur Freisetzung der DNS alkalisch lysiert (PCR: Clinical diagnostics and research; Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1992, S. 79–80), indem 250 μ l einer 200 mM NaOH-Lösung hinzugefügt, mit 100 μ l Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 20 Minuten in einem auf 95°C vorgeheiztem Thermomixer inkubiert wurden. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden 32 μ l Tris-HCl (pH 5,0) zur Neutralisierung hinzugefügt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Kontrollproben mit bidestilliertem Wasser wurden identisch behandelt, um mögliche Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen. 50 55

Die so gewonnenen Nukleinsäuren konnten in den Amplifikations- und Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden. 60

Beispiel 3

Nachweis von Legionellen (Gattung und Spezies)

Der Nachweis von Legionellen geschah durch erfundungsgemäße gattungsspezifische Amplifikation unter Einbau von mit Digoxigenin markiertem dUTP. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mittels der Reverse Dot-Block-Technik (Kawasaki et al: Genetic analysis using polymerase chain reaction – amplified DNA and immobilized oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing, in: Methods in Enzymology, Band 218, 65

1993) nachgewiesen.

1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

5 Boehringer Mannheim Terminal Transferase Kit 220-582

200 pmol Oligonukleotid
 20 μ l 5 x Reaktionspuffer
 6 μ l 25 mM CoCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
 10 8 μ l 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)
 2,4 μ l Terminal Transferase (60 U)
 ddH₂O ad 100 μ l

Gemisch eine Stunde bei 37° C inkubieren.

15 **2. Polymerasekettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte**

PCR 25 μ l Ansätze:

20 3,75 μ l dNTPs (1 mM Konz)
 1,25 Boehringer DIG DNS Labeling mixture
 2,5 μ l Perkin-Elmer Puffer I
 je 0,75 μ l Primer (Stammlösung 10 mM)
 1 μ l Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)
 25 H₂O ad 24 μ l
 1 μ s DNS

Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)

30 95° - 3 Min.
 95° - 30 Sek., 54° - 25 Sek., 72° - 30 Sek.: 30 Zyklen
 72° - 5 Min.
 herabkühlen auf 6°

35 **3. Vorbereitung der Membranen**

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 μ l (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml krenzlinken (Stratalinker®, Stratagene).

40 Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen):
 (alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)
 Waschlösung: 5 x SSPE, 0,5% SDS
 30 Minuten bei 61°
 45 Mit bidest. H₂O kurz waschen
 lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei -20° aufbewahrt werden.

4. Hybridisierung

50 **Prähybridisierung** -- in einzelnen, numerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

Lösung (je 300 ml) 5 x SSPE, 0,5% SDS,
 0,5% Dextranulfat

55 30 Min. bei 61°,

Hybridisierung

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.

60 Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 μ l der folgenden Lösung) gewaschen:

65 2 x SSPE
 0,1% SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

1993) nachgewiesen.

1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

5 Boehringer Mannheim Terminal Transferase Kit 220-582

200 pmol Oligonukleotid
20 µl 5 x Reaktionspuffer
6 µl 25 mM CoCl₂ (Endkonzentration 1,5 mM)
10 8 µl 10 mM dGTP (Gesamtmenge 80 nmol)
2,4 µl Terminal Transferase (60 U)
ddH₂O ad 100 µl

Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubieren.

15 2. Polymerasekettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte

PCR 25 µl Ansätze:

20 3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)
1,25 Boehringer DIG DNS Labeling mixture
2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I
je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 mM)
1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)
25 H₂O ad 24 µl
1 µs DNS

Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)

30 95° – 3 Min.
95° – 30 Sek., 54° - 25 Sek., 72° – 30 Sek.: 30 Zyklen
72° – 5 Min.
herabkühlen auf 6°

35 3. Vorbereitung der Membranen

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnitten 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml krenzlinken (Stratalinker®, Stratagene).

40 Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen):
(alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)
Waschlösung: 5 x SSPE, 0,5% SDS
30 Minuten bei 61°
45 Mit bidest. H₂O kurz waschen
lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei – 20° aufbewahrt werden.

4. Hybridisierung

50 Prähybridisierung – in einzelnen, numerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

Lösung (je 300 ml) 5 x SSPE, 0,5% SDS,
0,5% Dextranulfat

55 30 Min. bei 61°,

Hybridisierung

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.
60 Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:

65 2 x SSPE
0,1% SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

5. Detektion

Alle Schritte werden unter ständigem leichten Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffervolumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504):

- a) 30 Min. D1-Puffer
- b) 30 Min D2-Puffer
- c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren
- d) 2 x 15 Min. D1-Puffer
- e) kurze Inkubierung in D3-Puffer
- f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle plaziert:

45 µl NBT
35 µl X-Phosphat-Lösung
10 ml D3-Puffer

- g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.
- h) Stopflösung: D4-Puffer
- i) lufttrocknen

	Puffer	
20 x SSPE	3M NaCl, 175,3 g NaCl 0,2 M Na ₂ H ₂ PO ₄ , 27,6 g Na ₂ H ₂ PO ₄ 20 mM EDTA, 7,4 g EDTA pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml	25
2 x SDS	20 g SDS pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml	30
D1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,3% (w/v) Tween 20 pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen	35
D2	1,0% Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.	40
D3	100 mM TrisHCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ pH auf 9,5 bei 20° einstellen	45
D4	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH auf 8,0 einstellen	50

6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGCTTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2	50
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3	
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4	
21 mer: AATGTTTACITCTGAGTTCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5	55

60

65

5. Detektion

Alle Schritte werden unter ständigem leichten Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffervolumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504):

a) 30 Min. D1-Puffer
 b) 30 Min D2-Puffer
 c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren
 d) 2 x 15 Min. D1-Puffer
 e) kurze Inkubierung in D3-Puffer
 f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthüllle plaziert:

45 µl NBT
 35 µl X-Phosphat-Lösung
 10 ml D3-Puffer

g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.
 h) Stopplösung: D4-Puffer
 i) lufttrocknen

5

10

15

20

Puffer

20 x SSPE	3M NaCl, 175,3 g NaCl 0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 27,6 g Na ₂ HPO ₄ 20 mM EDTA, 7,4 g EDTA pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml	25
2 x SDS	20 g SDS pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml	30
D1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,3% (w/v) Tween 20 pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen	35
D2	1,0% Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.	35
D3	100 mM TrisHCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ pH auf 9,5 bei 20° einstellen	40
D4	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH auf 8,0 einstellen	45

6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGTCCTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2	50
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3	
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4	
21 mer: AATGTTTCACTTCTGAGITCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5	55

60

65

7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS)

	Gattungsonde:	
5	29mer: 5'-AACCAACCTGATAACCATCTCGAACTCAGAA-3'	SEQ.ID.No. 6
10	<i>L. pneumophila</i> -Speziessonde:	
10	31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGTAAACTCTGACTC-3'	SEQ.ID.No. 7
15	<i>L. anisa</i> -Speziessonde:	
15	36mer: 5'-ATGCGAATAACAAGATGTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 8
20	<i>L. micdadei</i> -Speziessonde:	
20	34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATAACAGAGTT-3'	SEQ.ID.No. 9
25	<i>L. brunneus</i> -Speziessonde:	
25	31mer: 5'-CCTGTTTTACAGAGCACTTAACAAATGCTCT-3'	SEQ.ID.No. 10
30	<i>L. cherríi</i> -Speziessonde:	
30	29mer: 5'-AATGCAAATAACAAGAAATTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 11
35	<i>L. cincinnatensis</i> -Speziessonde:	
35	27mer: 5'-CTCTCTTIRTTACCGGAAGTAACGCG-3'	SEQ.ID.No. 12
40	<i>L. dumoffii</i> -Speziessonde:	
40	26mer: 5'-ATCAATACTGGGGTAGGACACCTGC-3'	SEQ.ID.No. 13
45	<i>L. erythra</i> -Speziessonde:	
45	24mer: 5'-AACCCGGGTAAAGACCGGAAAAACC-3'	SEQ.ID.No. 14
50	<i>L. feeleii</i> -Speziessonde:	
50	27mer: 5'-GCAAAATGAAAGACAAATGCGTTGT-3'	SEQ.ID.No. 15
55	<i>L. israelensis</i> -Speziessonde:	
55	27mer: 5'-TTAACGCTTGTGAATCAAACCCATTC-3'	SEQ.ID.No. 16
60	<i>L. jordanis</i> -Speziessonde:	
60	27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCCTAACATGGG-3'	SEQ.ID.No. 17

7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS)

5	Gattungssonde:	
5	29mer: 5'-AACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAA-3'	SEQ.ID.No. 6
10	L. pneumophila-Speziessonde:	
10	31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGTAAACTCTGACTC-3'	SEQ.ID.No. 7
15	L. anisa-Speziessonde:	
15	36mer: 5'-ATGCGAATAACAAGATGTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 8
20	L. micdadei-Speziessonde:	
20	34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATAACAGAGTTT-3'	SEQ.ID.No. 9
25	L. brunensis-Speziessonde:	
25	31mer: 5'-CCTGTTTTACAGAGGACTTAACAATGCTCT-3'	SEQ.ID.No. 10
30	L. cherrí-Speziessonde:	
30	29mer: 5'-AATGCAAATAACAAGAAATTAGGTTGGGC-3'	SEQ.ID.No. 11
35	L. cincinnatensis-Speziessonde:	
35	27mer: 5'-CTCTCTTIRTTACCGGAAGTAACGCG-3'	SEQ.ID.No. 12
40	L. dumoffii-Speziessonde:	
40	26mer: 5'-ATCAAATACCTGGGGTAGGACACCTGC-3'	SEQ.ID.No. 13
45	L. erythra-Speziessonde:	
45	24mer: 5'-AACCCGGGTAAAGACCGGAAAAACC-3'	SEQ.ID.No. 14
50	L. feeleii-Speziessonde:	
50	27mer: 5'-GCAAAATGAAAGACAAATGCGTTGT-3'	SEQ.ID.No. 15
55	L. israelensis-Speziessonde:	
55	27mer: 5'-TTAAACGCTTGTGAATCAAACCCATTC-3'	SEQ.ID.No. 16
60	L. jordanis-Speziessonde:	
60	27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCCTAACATGGG-3'	SEQ.ID.No. 17

L. longbeachae-Speziessonde:

39mer: 5'-TGCTTGATATAAGATATAATACCTCTTATTTACCTGAG-3'

SEQ.ID.No. 18

5

L. maceachernii-Speziessonde:

32mer: 5'-GGCAATACTTTAATTAAAGGCATTAATGCCTA-3'

10

SEQ.ID.No. 19

L. moravica-Speziessonde:

23mer: 5'-AGGCCTGGGCTTGTGATTGAA-3' SEQ.ID.No. 20

15

L. sainthelensi-Speziessonde:

40mer: 5'-GTGCTGAATATAAGATATAATGTTACTCTCTTATTTACC-3'

SEQ.ID.No. 21

20

25

L. spirimenti-Speziessonde:

25mer: 5'-GTGTGCCCTGAAGAAGAACAGGGT-3'

SEQ.ID.No. 22

30

L. steigerwaltii-Speziessonde:

28mer: 5'-AATGTGTATACAAGCTGTAGGTGGCCA-3'

SEQ.ID.No. 23

35

L. wadsworthii-Speziessonde:

30mer: 5'-GTACGTACGAATTAGAGATTGGGTCTAGGC-3'

SEQ.ID.No. 24

40

8. Nachweisverfahren

a) Reverse dot-blot-Hybridisierung mit 4 verschiedenen Sonden

45

Gemäß obigem Arbeitsprotokoll wurden Nachweisverfahren unter Verwendung des gattungsspezifischen Amplifikationsverfahrens und einer gattungs-(A) bzw. 3-speziespezifischen (B: L. pneumophila; C: L. anisa; D: L. micdadei) Sonden durchgeführt. In Fig. 2 ist die Farbentwicklung an 10 Filtern gezeigt. Es ist klar erkennlich, daß die genus-(gattungsspezifische) Sonde (A) in jedem Falle ein Nachweissignal liefert. Die L. pneumophila-
spezifische Sonde (B) reagiert nur mit dem Filter, der auch den Serovar 1, Philadelphia von L. pneumophila
enthält. Mit der L. anisa-spezifischen Sonde (C) ist im Filter Nr. 4 ein deutliches Signal sichtbar. Die Spezies L. micdadei ließ sich mit der L. micdadei-spezifischen Sonde (D) nachweisen. L. gormanii konnte mit der gat-
tungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden (Filter Nr. 9).

50

55

Die Belegung der Filter mit nachzuweisenden Nukleinsäuren war folgende:

- 1: L. dumofii (2pmol probe)
- 2: L. anisa (2pmol probe)
- 3: L. anisa (4pmol probe)
- 4: L. anisa (8pmol probe)
- 5: L. micdadei ATCC 33218 (2pmol probe)
- 6: L. micdadei ATCC 33218 (4pmol probe)
- 7: L. micdadei L. 5443/90 (2pmol probe)
- 8: L. micdadei L. 5443/90 (4pmol probe)
- 9: L. gormanii
- 10: L. pneumophila sero 1 Philadelphia

60

65

Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region von *Pneumophila* und non-*Pneumophila* Spezies

In Fig. 3, 4 und 5 ist das Ergebnis der Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region mit Hilfe der gattungsspezifischen Primer gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt. Es ist klar erkennlich, daß in jedem Fall eine Amplifikation stattfindet, wobei sich in vielen Fällen die Größe der Amplifikate der einzelnen Spezies unterscheidet. Über die Größe der Amplifikate ist daher eine Unterscheidung der Spezies von *Legionella* nach gattungsspezifischer Amplifikation möglich.

1: *L. pneumophila* sero 12 570-CO-H (Fig. 3)
 10 2: *L. pneumophila* sero 13
 3: *L. pneumophila* sero 14 1169-MN-H
 4: *L. aniss* WA-316-C3
 5: *L. brunensis*
 6: *L. cherii* ORW
 15 7: *L. cincinnatensis* 72-OH-H
 8: *L. dumofii* NY-23
 9: *L. erythra* SE-32A-C8
 10: *L. feeleii* sero 1 WO-44C
 11: *L. feeleii* sero 2 691-WI-H
 20 12: *L. israelensis* Bercovier-4
 M: 100bp DNA size marker

1: *L. jordanis* BL-540 (Fig. 4)
 2: *L. longeachae* sero 1 Long Beach-4
 25 3: *L. longbeachae* sero 2 Tucker-1
 4: *L. maceachernii* PX-1-G2-E2
 5: *L. miedadei* TATLOCK
 6: *L. moravica* 316-36
 7: *L. oakridgensis* OR-10
 30 8: *L. rubrilucens* WA-270-C2
 9: *L. sainthelensi* Mt. St. Helens-4
 10: *L. spiritensis* Mt. St. Helens-9
 11: *L. steigerwaltii* SC-18-C9
 12: *L. wadsworthii* 81-716A
 35 M: 100bp DNA size marker

1: negative control (Fig. 5)
 2: *L. pneumophila* sero 1 Philadelphia 1
 3: *L. pneumophila* sero 2 Togu-1
 40 4: *L. pneumophila* sero 3 Bloomington-2
 5: *L. pneumophila* sero 4 Los Angeles-1
 6: *L. pneumophila* sero 5 Dallas-1B
 7: *L. pneumophila* sero 6 Chicago-2
 8: *L. pneumophila* sero 7 Chicago-8
 9: *L. pneumophila* sero 8 Concord-3
 45 10: *L. pneumophila* sero 9 IN-23-G1-C2
 11: *L. pneumophila* sero 19 Leiden-1
 12: *L. pneumophila* sero 11 797-PA-H
 M: 100bp DNA size marker

50 Anstelle der in Beispiel 3 verwendeten Primer B und D können auch Primer eingesetzt werden, deren Hybridisierungspositionen auf SEQ.ID.NO. 1 abweichen. Im folgendene sind konkrete Hybridisierungspositionen (erste Basenpaarung und Länge) von weiteren Primern angegeben. Auch bezüglich der gattungsspezifischen Sonde sind im folgenden gleichfalls geeignete Sonden angegeben. Ebenfalls im folgenden angegeben ist, welche Kombinationen der Primer für eine gattungsspezifische Amplifikation besonders geeignet sind.

Beispiel 4

Variationsmöglichkeiten der Primer und Sonden

60 Primer

Primer B — Variationsmöglichkeiten

65 1) Pos. 104, 18mer, T_m 43,9° (Primer B aus Beispiel 3)
 2) Pos. 105, 21mer, T_m 43,0°
 3) Pos. 110, 22mer, T_m 42,8°
 4) Pos. 103, 18mer, T_m 43,9°

5) Pos. 101, 19mer, T_m 42,7°		
6) Pos. 100, 19mer, T_m 43,5°		
7) Pos. 99, 20mer, T_m 44,2°		
8) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°		
9) Pos. 98, 20mer, T_m 43,5°		5
10) Pos. 94, 21mer, T_m 43,1°		
11) Pos. 104, 19mer, T_m 45,2°		
12) Pos. 105, 23mer, T_m 46,1°		
13) Pos. 113, 23mer, T_m 44,7°		
14) Pos. 102, 19mer, T_m 46,3°		10
15) Pos. 100, 20mer, T_m 45,0°		
16) Pos. 99, 21mer, T_m 45,6°		
17) Pos. 98, 21mer, T_m 45,8°		
18) Pos. 96, 22mer, T_m 45,5°		
19) Pos. 105, 22mer, T_m 45,1°		15
20) Pos. 109, 23mer, T_m 44,0°		

Primer D – Variationsmöglichkeiten

21) Pos. 316, 20mer, T_m 43,7° (Primer D aus Beispiel 3)		20
22) Pos. 312, 19mer, T_m 46,0°		
23) Pos. 317, 20mer, T_m 44,9°		

Primer A:

1) Pos. 34, 21mer, T_m 44,5°		
2) Pos. 35, 22mer, T_m 45,4°		
3) Pos. 37, 21mer, T_m 44,5°		
4) Pos. 39, 20mer, T_m 44,6°		
5) Pos. 38, 29mer, T_m 42,1°		30
6) Pos. 31, 18mer, T_m 43,1°		
7) Pos. 29, 18mer, T_m 45,9°		
8) Pos. 27, 18mer, T_m 43,2°		
9) Pos. 25, 18mer, T_m 45,4°		
10) Pos. 41, 19mer, T_m 43,8°		35

Primer C:

11) Pos. 286, 21mer, T_m 44,7°		
12) Pos. 286, 20mer, T_m 42,4°		40

Variationsmöglichkeiten der 5S-Gattungsonde (nur für Primerkombination B/D)

Pos. 268, 29mer, T_m 61,0° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)		
Pos. 269, 29mer, T_m 60,7°		45
Pos. 270, 29mer, T_m 60,7°		
Pos. 271, 30mer, T_m 61,5°		
Pos. 267, 29mer, T_m 61,4°		
Pos. 265, 27mer, T_m 60,5°		50

23S Gattungsonde (nur für Primerkombination A/C geeignet)

5'-TTGTAGTAATTGGCTGATTGTCITGACCATA-3'

SEQ.ID.No. 25 55

Variationsmöglichkeiten der L-pneumophila Spezessonde (nur für Primärkombination B/D und A/C geeignet)

Pos. 162, 39mer, T_m 59,1° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)		
Pos. 160, 32mer, T_m 59,3°		
Pos. 163, 31mer, T_m 60,1°		
Pos. 159, 33mer, T_m 59,4°		60

Die Positionsangaben (5'-terminale Base) beziehen sich auf die in Fig. 1 abgebildete Sequenz, wobei Primer B und A komplementär zu den Teilen der Sequenz von Fig. 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen, und Primer D und C sequenzidentisch zu den Teilen der Sequenz von Fig. 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen und sich stromabwärts (von der Sequenz in Fig. 1 aus gesehen) fortsetzen.

Primerkombinationen

	Primer B/D	Primer A/C
5	1/21	1/11
	2/21	2/11
	3/21	3/11
	5/21	4/11
10	6/21	5/12
	7/21	6/12
	9/21	7/11
	10/21	8/12
	11/22	9/11
15	12/22	10/11
	13/22	
	14/22	
	15/22	
20	16/22	
	17/22	
	18/22	
	11/23	
	4/23	
25	19/23	
	20/23	
	8/23	
	17/23	

30 Alle angegebenen Primer und Nukleotidsequenzen sind DNS (Oligonukleotide im Falle der Primer und Sonden) linear, einzelsträngig.

35 Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Sonden spezifisch für Legionella, d. h., sie besitzen keine Wirkung als Primer bzw. Nachweissonden für Organismen, die nicht zur Gattung Legionella gehören. Die Primerpaare B/D und A/C wurden als nicht wirksam gegenüber *Bacillus cereus*, *Branhamella catarrhalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium africanum*, *avium*, *bovis*, *flavescens*, *fortuitum*, *gordanae*, *kansasii*, *terrae* and *xenopis*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *milleriae*, *pneumoniae* and *viridans* and β -hemolytic *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis* and *Vibrio cholerae* charakterisiert.

45

50

55

60

65

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:	5
(i) ANMELDER:	
(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH	10
(B) STRASSE: Sandhoferstr.116	
(C) ORT: Mannheim	
(D) LAND: DE	15
(F) POSTLEITZAHL: 68305	
(G) TELEFON: 0621 759 4348	
(H) TELEFAX: 0621 759 4457	20
(ii) BEKREICHUNG DER ERFINDUNG: Gattungs- und speziesspezifische Identifizierung von Legionellen	
(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68	25
(iv) COMPUTER-LESEBARE FASSUNG:	
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk	
(B) COMPUTER: IBM PC compatible	30
(C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS	
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)	
	35
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 336 Basenpaare	40
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	45
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure	
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Konsensussequenz"	
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:	50
(A) ORGANISMUS: Legionella	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:	55
GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCTGAAAG CCCGGTTGAAG ACTACGGACGT TGATAGGCAC	60
GGTGTGGAAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTTGACTTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AATGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGCTA TACGTGAAAC GTATCGTCTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CGCTGGCTT AATATAGCAA TCAAACCCTC AGGTAAACCA	240
	65

GTTCCTCCGG CCACCTATGC GATTCGAAC CACCTGATAAC CACCTCGAAC TCGAAGTCA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGCC TTCCTC	336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

30	GGCTGATTGT CTTGACCA	18
----	---------------------	----

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

55	AGGAGGCCTC ACACATATCAT	20
----	------------------------	----

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 5
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN 10
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella 15
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GTGGAAGACT AGGACGTTGA TAGG 24 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN: 25
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear 30
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide" 35
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella 40
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AATGTTTCAC TTCTGAGTTC G 21 45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6: 50
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare 55
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure 60
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA 65

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMPT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

5 AACCCACCTGA TACCATCTCG AACCTCAGAA

29

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZERKENNZEICHEN:

15 (A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMPT:

30 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

35 ACGTGAAACG TATCGTGTAA ACTCTGACTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZERKENNZEICHEN:

40 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

45 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

50 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

55 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMPT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

60

ATGCCAATAC AACATCTTACG TTGGCC

26

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENKENNEZICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

5

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATGTAATTG CTCAGACAAA TGAATACAGA GTTT

34 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENKENNEZICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

30

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

35

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

40

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

45

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCCTTCTTTA CAGAGGACTT AACATGGCTC T

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

55

(i) SEQUENKENNEZICHEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare

60

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

65

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella cherrii
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

15 ATGCAAATA CAAGAAATT AGGTTGGC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatensis
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

40 CTCTCTTTTTT TTACGGGAGG TAACGGC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATCAATAACCT CGCGCTTGGAC ACCTTC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

15

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

20

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella erythra

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

25

AACCCCGGTA AGACCGGAAA AACG

24

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

35

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

50

GCAAAATGAA AGAGACAAATG CGTTTGT

27 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

60

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

65

5 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 10 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella israelensis
 15 (xi) SEQUENZBESCHRÄNKUNG: SEQ ID NO: 16:

TTAACCGTT CTGAATCAA CGCATTC

27

20 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 25 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 30 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 40 (A) ORGANISMUS: Legionella jordanis
 (xi) SEQUENZBESCHRÄNKUNG: SEQ ID NO: 17:

45 TGTGAAATCA ATATCCCTTA ACATCGG

27

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 55 (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 60 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (iv) ANTISENSE: JA

65

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

5

TGCTTGATAT AAGATATAAT ACCTCTTAT TTACCTGAG

39

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella maccacharnii

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGCAATACCTT TAATTAAGG CTTAAATGCC TA

32 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

40

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

45

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

50

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella moravica

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

60

AGGCCTTGGG CTTGTTGATT GAA

23

65

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella saintthalensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

25 GTGCTGATAA TTAGATATAA TTTTACCTC 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella spiritensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

50 GTGTGCCCCG AACGAGAAC AGGGT 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

65

TTGTAGTAAT TGGCTGATTG TCTTGACCAT A

31

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Philadelphia-1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Olphila

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CGCCTGAAAG CGTGAACCTA ACTTGACTA ATTCGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTAACTTCA GAAATGATA TTGATTGTA TACCTGATAM CTATCGTGA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT ATTAAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTGTTCCCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTGGAC TCAAGAGTGA	300
AACATTTCGG CGCCATGAT ACTTGAGGC TTCCCTC	336

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Knoxville-1
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 02knox

60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
--	----

65

GGTGTGGAG CGCAGTAATG CGTGAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATGCCA TCAAGCCTC AGCTAACCA 240 5
 GTTTTCCCTG CGACTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC 336

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Bemidorm 030E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 04beni

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTGAG CGCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60 35
 GGTGTGGAG CGCAGTAATG CGTGAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT 180
 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATATGCCA TCAAGCCTC AGCTAACCA 240 40
 GTTTTCCCTG CGACTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA 300
 AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC 336

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

50

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

60

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: France 5811

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05fran

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

5	CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGGCCT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAGG CCCACTAATG CGTGTGAGCTA ACTTGTACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTGTGACTCA GATTATGATA TTGATTGATA TACGTGAAAC GTATGGTGTAA	180
10	AACTCTGACT CTTTACCAA CGCTGAGCTT AATAGAGCAA TTTAGGCTC AGGTAATCCA	240
	GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTGGAAC TCGAGACTCA	300
	AACATTTCCG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC	336

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZERKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMMFT:
 - (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 - (B) STAMM: GLD1
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05alda

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

40	CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGGCCT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAGG CCCACTAATG CGTGTGAGCTA ACTTGTACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTGTGACTCA GATTATGATA TTGATTGATA TACGTGAAAC GTATGGTGTAA	180
45	AACTCTGACT CTTTACCAA CGCTGAGCTT AATAGAGCAA TTTAGGCTC AGGTAATCCA	240
	GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTGGAAC TCGAGACTCA	300
	AACATTTCCG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC	336

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZERKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 335 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: Oxford 4032E
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 07oxfo

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAGG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CCCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTCGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCGA GAAATGATT TTGATTGATA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCGTGGCTT ATATATGCAA TCAAGCCTCA CGTAAACCCAG	240
TTTCCCTGGC GCACTATAGCG ATTTGGAAAC ACCTGATACCC ATCTCGAACT CAGAAGTCGA	300
ACATTTCCGC GCCAATGATA GTGTGAGGCT TCCTC	335

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRUNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: Campyldown-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 08Camp

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAGG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CCCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTCGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCGA GAAATGATT TTGATTGATA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCGTGGCTT ATACATGCAA TCAAGCCTCA ACCTAATGCA	240
TTTCCCTGGC GCACTATAGCG ATTTGGAAAC ACCTGATACCC ATCTCGAACT CAGAAGTCGA	300
ACATTTCCGC CGCCAAATGATA AGTGAGGCG TTCCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Togus-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 09tog

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
CGTGTGGAG CCCAGTAATG CCTGAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACG	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATA TTGATTTGTA TACCTGATAA GTATCGCTGA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA	240
GTTTTCTCG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAAGACTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Bloomington-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 108loom

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
CGTGTGGAG CCCAGTAATG CCTGAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACG	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATA TTGATTTGTA TACCTGATAA GTATCGCTGA	180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAMCCA	240
GTTTTCTCG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAAGACTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

5

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Los Angeles-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 11sg41a

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCGTTGAAAG ACTACGGACGT TGATAGGCAA	60	25
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTAACTTCA GAATGTATAA TTGATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTAA	180	
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGCGTT AATAGTGTAA TCAAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	30
GTTCCTCGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAAGAAGTGA	300	
AACATTTCCG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336	

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

40

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

50

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Portland

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 12sg4pc

55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAAG CCCGTTGAAAG ACTACGGACGT TGATAGGCAA	60	60
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTAACCTTCA GAATGTATAA TTGATTGAA TACCTGATAC GTATCGTGTAA	180	
AACTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGCGTT AATAAAGCAA TCAAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	65

GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTCGAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAACTCA 300
 AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Cytos-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 20 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Dallas-1E
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 13sg5da
 25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

30 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAG 60
 CGTGTGGAGG CGCAGTAATG YGIGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCCTGACC 120
 ATATAATCTG AGTGTCTTCA GAATGTTAA TTGAAATTGAA TACGAAACAC GCATCGCTA 180
 35 AACTCCGACT CTTTACCAA CCTGTCGCTT AATAGTGTAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240
 GTTTCTGG CGACTATAGC GATTCGAAC CACCTGATAC CATCTGAAC TCAGAACTCA 300
 AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCCCTC 336

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Cytos-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 55 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
 (B) STAMM: Cambridge-2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 14sg5cam
 60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

65 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCAG 60

GGTGTGGAAG CGCGTAAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTGTA	180
AACTCTGACT CCTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTCTTGG CGACTATAGCC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCGAGACTGA	300
AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 15sg6ch

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCGTTGAAG ACTACGGACGT TGATAGCAA	60	35
GGTGTGGAAG CGCGTAAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGAACCTCA GAATATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTGTA	180	
AACTCTGACT CCTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	40
GTTTCTTGG CGACTATAGCC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCGAGACTGA	300	
AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336	

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

50

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

60

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 16sg7

65

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

5	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60
	GGTGTGGAG CGCAGTAATG CCTGAAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
10	ATATAATCTG ACTGACTCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GATATCGCTGA	180
	AACTCTGACT CTTTACCCAA CCTCTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
	GTTCCTGCG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300
	AACATTTCCG CGCCAAATGAT ACTGTGAGGA CTCCCTC	336

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 20 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Kinselstrang
- 25 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

30 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMMFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila
- (B) STAMM: Concord-3
- 35 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 17sg8

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

40	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60
	GGTGTGGAG CGCAGTAATG CCTGAAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
45	ATATAATCTG ACTGACTCTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GATATCGCTGA	180
	AACTCTGACT CTTTACCCAA CCTCTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
	GTTCCTGCG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300
	AACATTTCCG CGCCAAATGAT ACTGTGAGGT CTCCCTC	336

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 55 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Kinselstrang
- 60 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: IN-23-G1-C2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 18sg9

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAAG CGCACTAATG CGTGAACTTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTCACTTCA CATTATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC CTATCGTGT	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA	240
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAGTGA	300
AACATTTCCG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*
 (B) STAMM: Leiden-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 19sg10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAAG CGCACTAATG CGTGAACTTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTCACTTCA CAAATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC CTATCGTGT	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AAYAYAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA	240
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAGTGA	300
AACATTTCCG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid

65

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 797-PA-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 20sg11

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

5	GCCTCCCTCA AGATGACTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60
10	GGTGTGGAAG CCCACTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTCGCTGAT TGTCTTGACC	120
15	ATATAATCTG ACTGACTTCA GAATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA	180
20	AACTCTGACT CTTERCCAAA CCTGTGGCTT ATATAATCCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCCA	240
25	GTTTTCCCTGG CGAGTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAAGAAGTGA	300
	AACATTTCCG CGCCAATGAT ACTGTGAGCC TTCTCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZMERkmÄLICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: S70-CO-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 21sg12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

5	GCCTCCCTCA AGATGACTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60
10	GGTGTGGAAG CCCACTAATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTCGCTGAT TGTCTTGACC	120
15	ATATAATCTG ACTGACTTCA GAATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTAA	180
20	AACTCTGACT CTTERCCAAA CCTGTGGCTT ATATAATCCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCCA	240
25	GTTTTCCCTGG CGAGTATAGC GATTTGAAAC CACCTGATAC CATCTGAAAC TCAAGAAGTGA	300
	AACATTTCCG CGCCAATGAT ACTGTGAGCC TTCTCTC	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 336 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	5
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	10
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:	
(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila	15
(B) STAMM: 82-A-3105	
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 22sg13	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:	20
GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAG CCCGGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
GGTGTGGAGG CGCGAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120 25
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAAATGTGATA TTGATTGTA TACGTAAAC GTATCGTCTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAACCCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAAGAAGTGA	300 30
AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC	336
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:	35
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 336 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	40
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA	45
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:	
(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila	50
(B) STAMM: 1169-MM-H	
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 23sg14	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:	55
GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCCATGAG CCCGGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGC	60
GGTGTGGAGG CGCGAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120 60
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAAATGTGATA TTGATTGTA TACGTAAAC GTATCGTCTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AAYAYGGCAA TCAAACCCCTC AGGTAAACCA	240
GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAAGAAGTGA	300 65

AACATTTCCG CGCCAAATGAT AGTGTGACCC TTOCTC

336

5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare
 10 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Cytosin-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa
 20 (B) STAMM: WA-316-C2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 24ani

25 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

GAAGCCTCCC TCAAGATGAG TTTCCCATG AAGCCCGTTG AAGACTACCA CTTTGATACG	60
CAAGCTGTCG AACCACAGTA ATGTGTGAG CTAACITGTA CTATTTGGCT GATTGTCTTC	120
ACCATAATAAT CTGAGTTACT TCAGATTGTC AATGGGATA CAAGATGAG GTGGGGCCAA	180
GGCTCAACCT ACCCAGAACT ACTTGAAACA ATGTGTGAC TTCCTTATTT ACCTTAACCT	240
TGATTGAGCT ATAATGCCCT ACAATCAATG CAAACCCAT TTCTCTGGCG ACCATAGCCG	300
TTTGGAAACCA CCTGAAATCCA TCTCGAAACTC AGAACTAAAG CGAACCCCGG CCGATGATAC	360
TGTGAGGTTT CCTC	374

40 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare
 45 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

50 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Cytosin-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACCACGACCT TGATAGGCGA	60
GGTGTTGAG CCCGAAATG TGTGAGCTA ACTCGTACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG ATGACTTCCG CCTTATGATA CAAGATGATA GATTATCCCG TAAGGCACCT	180

GTGTTAACCC TTTTTTACTT TACCGCCCTG TTTTACAGA GCACCTAACCA ATGCTCTTAA	240
TCACACAGGAC AACAGTTTTC CTGGCCACCA TAGCGGTTTG GAACCCACCTG ACTCCCATCTC	300
GAACTCAGTA GTGAAACAGA CCAGGCCGGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC	350

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 317 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatensis

(B) STAMM: 72-OH-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 29c in

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

GCCTCCCTCA ACCTGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAG ACTACCACTGT TGATAGCCAA	60
GGTGTGGAAG CCTACTTATG CCTGAAGCTA ACTTGTACTTA ATTCGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTTACCTTCA GACTGAAACA GAAATATAAGT GACACCATGA CTCTCTTTTGT	180
TTACCCGAAG TAACGGCTC CAAAGCCGCC TACTCAAAAC ACTTTTCTG GCAACCATAG	240
CGGTTTGGAA CCACCTGATT CCATCTGAA CTCAGTAGTC AAACGAACAT GCGCCAAATGA	300
TAGTGTGAGG TTTCCTC	317

30

60

120

180

35

240

300

317

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 359 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii

(B) STAMM: NY-23

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 31DUMO

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

45

50

55

60

65

65

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAAG CCCGTTGGAG ACTACCGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAAG CGCAGTAATG CGTGGAGCTA ACTTGACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 ATATAATCTG AGTAACTTCA GATTAACCTGA ATCAAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGCCCG 180
 10 AAATAAATAC AAAATAGTGT GTCCTCTTAA TTTACCTCGT GCATGATTGCG GGTATAATAT 240
 GCCCAATTGA TCAATGTCAAA CCAGTTTCC CGGCHACCAT AGGGGTTTGG AACCCACCTGA 300
 ATCCATCTCG AACTCAGAAG TGAACGGAAC ATGCCCTAT GATAGTGTGA CGCTTCCTC 359

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 362 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella cherrill
 30 (B) STAMM: ORW
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 30che
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

35 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAAG CCCGTTGGAG ACTACCGACGT TGATAGGCAA 60
 GGTGTGGAAAG CGCAGTAATG TGTGGAGCTA ACTTGACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC 120
 40 ATATAATCTG AATTAACCTCA GATTAACCTGA ATCAAATACCA AAATAATTAA CGTTGGGCCA 180
 CGGCCCAATC TGCATAAAAATG ATGTTACTC TTTATTTACC TAACGGATGA TTCCGGTATA 240
 ATGCCGCCCCAT TAATCATGTT AAACCACTTT TCCCTGGCCAC CATAGCGTT TCGAACCCACC 300
 45 TCACTCCATC TCCAACTCAG AAGTGAACCG AACCCGGGCC AATGATACTG TGAGGTTTCC 360
 TC 362

50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

55 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 325 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 60 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella erythra

(B) STAMM: SE-32A-CS

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 32ERY

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

5

GCCTCCCTCA AGATCAGTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGGAA	60
GGTGTGGAAG CGTACTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTUGCTGAT TGTCTTGACT	120
ATATAACCTG ATCCGCTTCA CGTTATATGG ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTTTACCG	180
GCCTCGTGGC CAACCCGGGT AAGACCGGAA AAACCATGAT CCTTAAACCG TTTTCCGGC	240
GACCATAGCA GTTTGGAAAC ACCTGAATCC ATCTGAAACT CAGAAGTGAA ACAGACTCGC	300
CCCGATGATA GTGTGAGGCT TCCTC	325

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 342 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

35

(B) STAMM: WO-44C

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 33feal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

40

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGGAA	60
GGTGTGGAAG CCCACTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTUGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AATTGCTTCA AGTTATAGG CAAATAATGAA AGACAAATGC GTTGTGTTA	180
CCTCATATC TTTCACCGCC TGCCTGGCTGA CCACCTAACC CTGCTTTATC CAGAACACGGC	240
AAACCCGTTT TCCCTGGCAC CATAAGCGTT TGGACCCACG TGACTCCATC TCGTACTCG	300
AAGTGAACCA AACCCGGGCC GATGATMTCG TGGAGTTCT CC	342

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 349 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

65

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

(B) STAMM: 691-WI-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 34feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

15	GGGGGAGCC TCCCTCTAAGA TCACTTTTCC CATGAAGCCC GTTGAAGACT ACCGACCTGA	60
15	TAGGCGAGGT GTGGGAGCCGC AGTAATGGCT CAAAGCTACT CGTACTTAATT GGCTGATTGT	120
15	CTTGACCAATA TAAACCTTAAT TCCCTTGAGG TTATAGGCAA AAATGAAAGA CAAATGCCCT	180
20	TGTGTTACCT CATAATCTTT ACCGGCCCTTC TGGCTGAGCA CTTAAACCTG CTTTATCCAG	240
20	ACAGGCAAA CCCGTTTTCG TCCCACCAT ACCGGTTTGG AACCCACCTGA CTCCATCTCG	300
20	AACTCAGAAG TGAAACAAAC CCCGGCCGAT GATACTGTGG AGTTTCTCC	349

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 321 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Cancer-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella israelensis

(B) STAMM: Barcovier-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 361er

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

35	CCCTTCCTCA AGATGACTTT TCCCTTGAG CCCGTTGAAG ACCGACGACGT TCACTGGCGA	60
35	GGTGTGGAAG CCCACTAATG TGTGAACTCA ACTGCTACTA ATGGGCTGAT TCACTTGACC	120
35	ATATATCTTG AAATCATTCA CCCCTGAAAGA CAAATGAGT TTAAACGCTT GTGAATCRAA	180
45	CCCATTCAT CTTTACCCCTC TGGCTTCAT AACGCAAGAT AACCCGTTT CCTGGGACCC	240
45	ATAGCTGTTT GGTACCCACCT GATACTTTTC CGAACTCAGT AGTGAACAA ACACGGCTCG	300
45	ATGATAGTGT CCCGCTCTCC C	321

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 348 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		5
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN		
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMPT:		
(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis		10
(B) STAMM: BL-540		
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 38jor		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:		15
GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60	
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG TGTGAACCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	20
ATATAACCTG AATGGCTTTT ATGTCGCAAG TCAAAAGACAA CGCTTGGCAA GCTTCGTGTTG	180	
CCCTTATATT TATCTTACCC AGCCTGATGA ATGAATATCC CCTAACATGG GTATTTGCTC	240	
AGCAGGACAA CGTTTTCTCT GGCGGACCTA CGCGTTGGGA ACCACCTGAC TCCATCTCGA	300	25
ACTCAGACT GAAACAGACC AGCCTGGATG ATAGTGAGTG CCTTCCTC	348	
 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:		30
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:		
(A) LÄNGE: 312 Basenpaare		
(B) ART: Nucleotid		35
(C) STRANGFORM: Einzelstrang		
(D) TOPOLOGIE: linear		
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA		40
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN		
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKOMPT:		
(A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae sero.1		45
(B) STAMM: Long Beach-4		
(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 39long1		
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:		50
GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTGAG CCCGTTGAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60	
GGTGTGGAAG CGTACTTAATG CGTGAAGCTA ACTCTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	55
ATATAATCTG AGTTACTTTT GATTATGCTT GATATATGAT ATAATACCTC TTTATTTACC	180	
TGAGTATCAT CCCAAATATG CGCGATACTC AAACAGTTT TCCGGCGAC TATAGCCGTT	240	
TGGAACCAAC TGAATCCATC TCGAACTCAG AAGTGAACCG TACATGGCC AATGTAGTC	300	60
TGAGGCTTCC TC	312	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

5 (A) LÄNGE: 312 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

15 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae sero.2
 (B) STAMM: Tucker-1
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 40long2

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

25	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG CGTAGTATG CGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTTACCTTA GATTATGCTT GATATAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC	180
30	TGACTATCAT CCCATAATG CGCGATACTC AAAAACTTT TCCCTGGGAC TATAGGGTT	240
	TGAAACCCACC TGAATCCATC TCGAAGCTAG AAGTGAAGG AACATGCCGC AATGATAGTC	300
	TGAGGCTTCC TC	312

35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40 (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

50 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella nachbarchamnii
 (B) STAMM: PX-1-G2-E2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 41mac

55 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

60	GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
	GGTGTGGAAG CACAGTATG TGTGTAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAACCTG AGCTGCTTTT AGCTTGAGA CTAACTGATA AGCGAACTCT TTAATTAAG	180
65	GCATTAAAGC CTAGGCTTTT CTGCTTACCT CTAAACCCCTT TACCGAGCTG ATTGGCCGAT	240

DE 195 15 891 A1

ACGCCAATCG CTAAACCACT TTTCTGGCG ACCATAGCGG TTTGGAACCA CCTGATCCA	300
TCTCGAACTC AGAACTGAAA CAGACCTGGG CCAATGATAG TGTGGGCTT CCCC	354

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(B) STAMM: Tatlock

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 42micd

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

GAAGCCCTCCC TCAAGATGAG TTTTCCATG AGGCCCCTG AAGACTACGA CGTTGATAGG	60	30
CGAGGTGTGG AAGCACACTA ATGTGTGTAG CTAACCGTA CTAATTGGCT GATTGTCTTG	120	
ACCATATTCAC CTGAACTGCC TTTAGTTAT CACTGAACAA GCGAGGCAAT ATTGAATGAC	180	
AGGGCAATGT AAATTGCTCA GACAAATGAA TACAGAGTTT GTGTTAACCT CTATCCACTT	240	35
TACCAAGCTG ATTGGTTAT AGCCCAATCG CTTAACCCGG TTTCTGGCG ACTATAGCGG	300	
TTTGGAAACCA CCTGATCCCA TCTCGAACTC AGAACTGAAA CTTACCTGGG CCAATGATAG	360	
TGTGGGGCTT CCCC	374	40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 340 Basenpaare

45

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella moravica

60

(B) STAMM: 316-36

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 43mou

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

65

5	GGCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCGATGAG CCCGGTGAAG ACTACGGACGT TGATAGGCCA	60
	GGTGTGGAA CGCGATTAATG TGTGAAGCTA ACTCTGACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
	ATATAATCTG AGTTACTTCG GGTATAGAA GTAGACGATA AAATAGAOTA GATATGTTA	180
	CCTCGAATCT TTACCGAGCC TTGGCTTGT TGATTGAACN CAATCATCAA TCTGAAAGTA	240
10	AACAGTTTTC CTGGCGACAA TAGGGTTTG GAACCACTG ATCCCATCTC GAACTCAGAA	300
	GTGAAACGAA CATGGCCGAA TGATAGTGTG AGGCCTTCCTC	340

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

15 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 302 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- 20 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- 25 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

 - (A) ORGANISMUS: Legionella oakridgensis
 - 30 (B) STAMM: OR-10
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 44oak

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

35	ACCTCTCCCTCA GAGATGAGTT TTCCCGATGAA CCCGGTGAAG GACCGACGAC TGATAGGCCA	60
	ACGTGTGGAA CGCGATTAATG ACCTGAAGCT AACTCGTACT ATGGCTGAT TGTCTTGAC	120
40	CATATAACCT GAGTTGATTC AGGTTAACGC ATGGCTTGT GTATCCCTCA ATCTTTACCA	180
	CTTGGAGCCG TAAAGCTTCCA ATACGTTT TCCGGCGAC CATAACCGTT TGGAAACCCAC	240
	TGATACCATC CGGAACTCTAG AAGTGAACG AACGGCGCC AATGATAGTG TGGGGCTTCC	300
45	CC	302

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 323 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- 55 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- 60 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

 - (A) ORGANISMUS: Legionella rubrilucens

(B) STAMM: WA-270A-C2
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 45rub
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

5

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60
GGTGTGGAAG CGCTAGTAATG CGTGAAAGCTA ACTTGCTACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG ATACGCTTCA GGTTATAGCA ATACATGAA TGTGACTCTA TTTTTTACCC	180
GCCTCATGGC CAGCGGTTAA CACCGTTGCC ACCATGACCC TTAAACCGTT TTCTGGCGA	240
CGATAGCAGT CTGGAACCCAC CTGAATCCAT CTGGAACCTCA GAACTGAAAC AGACTCGCGC	300
CGATGATAGT GTGAGGTTTC CTC	323

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 316 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

 - (A) ORGANISMUS: Legionella saintlensis
 - (B) STAMM: Mt.St. Helens-4
 - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 46saint
 - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

30

35

40

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60
GGTGTGGAAG CGCTAGTAATG CGTGAAAGCTA ACTTGCTACTA ATGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTTACTTCA GATTGTGCTG AATATAAGAT ATAAATGTTAC TCTCTTTATT	180
TACCTGACTA TCAGGCGGCT AATGACGGAT ACTGAAACCA GTTTTCTGG CGACCATAGC	240
CGTTTCTAC CACCGATTC CAGCTCGAAC TCAGAACTGA AACGAAACATG CGCCCATGAT	300
AGTGTGAGGC TTCCTC	316

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 350 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

60

65

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

5 (A) ORGANISMUS: *Legionella spiritensis*
 (B) STAMM: Mt. St. Helens-9
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 47spir

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAAG CCTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
15 ATATAACCTG AATGACTTCG GGTATTGAT ACGAAAGATA CGAAAGAAG CAGAACGAT	180
TGTGTACCG AATATCTCT TACCAAGCTG TGGTGTCCCC TGAAAGAA ACAGGGTTAC	240
20 GACTCAGGAT AACCGTTTC CTGGGGATTA TAGCCGCTGC GAAACACCTG ATTCCATCTC	300
GAACTCAGAA GTGAAACCCA CGTAGCCGA TGATAGTGTG CGGTCTCCCC	350

25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30 (A) LÄNGE: 360 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

35 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

40 (A) ORGANISMUS: *Legionella steigerwaltii*
 (B) STAMM: SC-18-C9
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 48steig

45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAAG CCTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
50 ATATAACCTG AATGACTTCG GGTATTGAT ACGAAAGATA CGAAAGAAG CAGAACGAC	180
CACAAACCTAC AGAAATAAT TCTTAACCTT TTATTTACCT AATGATGAT TCGGTATAA	240
55 TACCCCCAAC ATCAGTAAAC ACCAGTTTC CTGGGGATTA TAGCCGTTTG GAAACACCTG	300
ACTCCATCTC GAACTCAGAA GTGAAACAGA CCGGGCGCAA TGATAGTGTG AGGTTTCCTC	360

60 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

65 (A) LÄNGE: 366 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 5
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Legionella wadsworthii 10
 (B) STAMM: 81-716A
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 49wad
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68: 15

GCCTCCCTCA AGATGAGTT TCCCTTCAAG CCCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAAG CCCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGAC	120 20
ATATATATCTG AGTTACCTCA GGTTAACCTGA TAAGTACGTA CGAATTAGAG ATTGGGTCTA	180
GGCCCATCTT AAAAAAAATA AAAAAATGTC AACCTTTTA TTTACCTATA GCATGATTAG	240
GGTATAATAC GCCCAATTCA TGCGAAACCA GTTTTCTGG CGACAAATAGC GGCTTGGAAC	300 25
CACCTGATCC CATCTCGAAC TCGAGGTGA AACGAGGATG CGCCAAATGAT AGTGTGAGGT	360
CTCCTC	366

30
 Patentansprüche

1. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung Legionella amplifiziert werden. 35
2. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäuren aller möglichen Spezies einer Gattung Legionella in einem Amplifikationsverfahren unter Verwendung von weniger als 7 Primern amplifiziert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifikate differenziert wird.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit einer gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe speziespezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Spezies untersucht werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe von Legionella-Untergruppen spezifischer Sonden auf die Anwesenheit von Legionella-Untergruppen untersucht werden. 45
7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Amplifikation eines Teilstückes der Nukleinsäuresequenz der Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilstück sowohl Teile der 23S-Region und der 5S-Region, als auch die dazwischen liegende Spacerregion umfaßt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation unter Verwendung zweier Primer durchgeführt wird, von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region hybridisiert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzen Sequenzen enthalten, die ausgewählt sind aus mindestens 15 Basen langen Sequenzen, die zumindestens 90% homolog mit oder komplementär zu Teilsequenzen der SEQ.ID.No. 1 sind. 55
10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zumindest 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist, oder die zumindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde keine weiteren Legionella-spezifischen Sequenzen aufweist, die mehr als 15 Basen lang sind.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß vor Verwendung der Nukleinsäuresonde ein Amplifikationsverfahren gemäß Anspruch 9 durchgeführt wird und die Sonde mit einem Strang des amplifizierten Teilstückes hybridisieren kann.
13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe aller möglichen Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen wird. 65
14. Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella, welche zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist, oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der

SEQ.ID.No. 1 ist.
15. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie gattungsspezifisch ist.
16. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von SEQ.ID.No. 1 zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 oder 307 und 286 liegt.
5 17. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 oder 307 und 286 einschließt.
18. Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.
19. Doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die Spacerregion anschließen.
10 20. Nukleinsäure gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 371 bp lang ist.
21. Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend
15 – mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und
 – mindestens eine Legionella-speziespezifische Sonde.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Fig. 1

1: GCCTCCCTCAAGATGAGTTTCCCATGAAGCCCGTTGAAGACTACGACGT

51: TGATAGGCAAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTGAAGCTAACTGTACTA

23S/Spacer

101: ATTGGCTGATTGTCTTGACCATATAATCTGAGTGACTTCAGAA/TGTGATA

151: TTGATTGTATACGTGAAACGTATCGTGTAAACTCTGACTCTTACCAAA

Spacer/5S

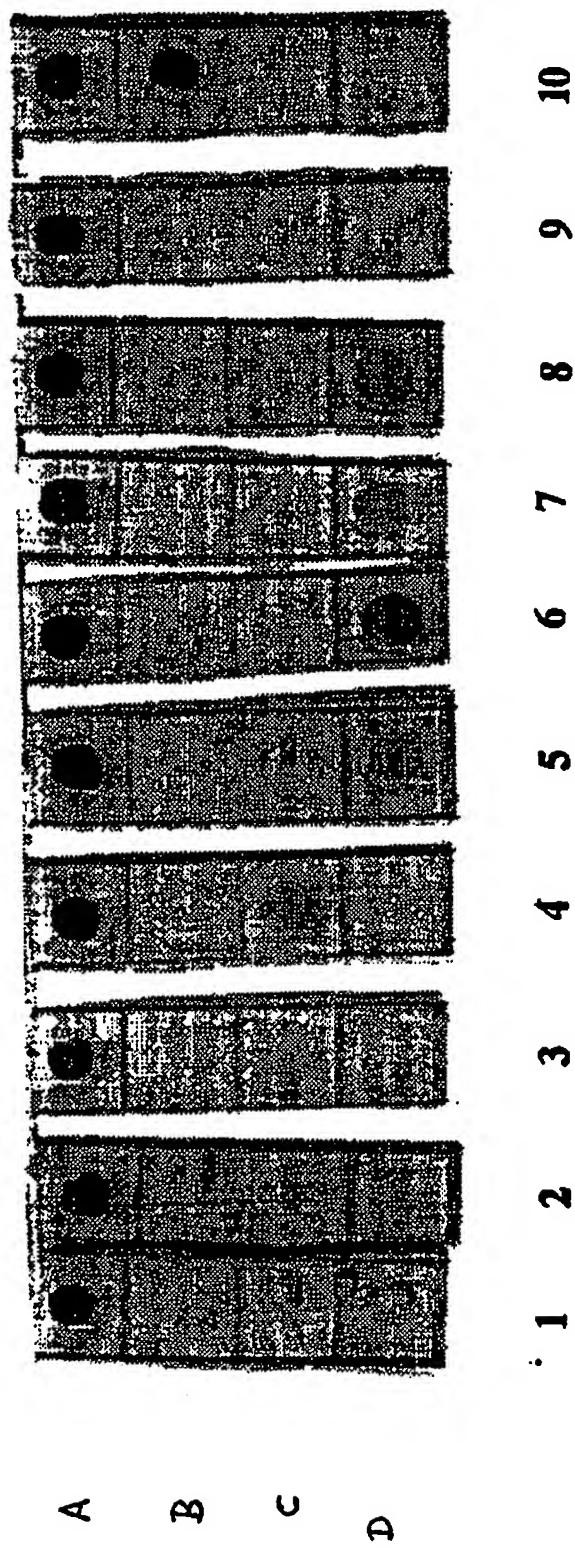
201: CCTGTGGCTTAATATAGCAATCAAAGCCTCAGGTAAACCCAGTT/TCCTGG

251: CGACTATAGCGATTTGGAACCACCTGATACCATCTGAACTCAGAAGTGA

301: AACATTCCGCGCCAATGATAGTGTGAGGGCTTCCTC

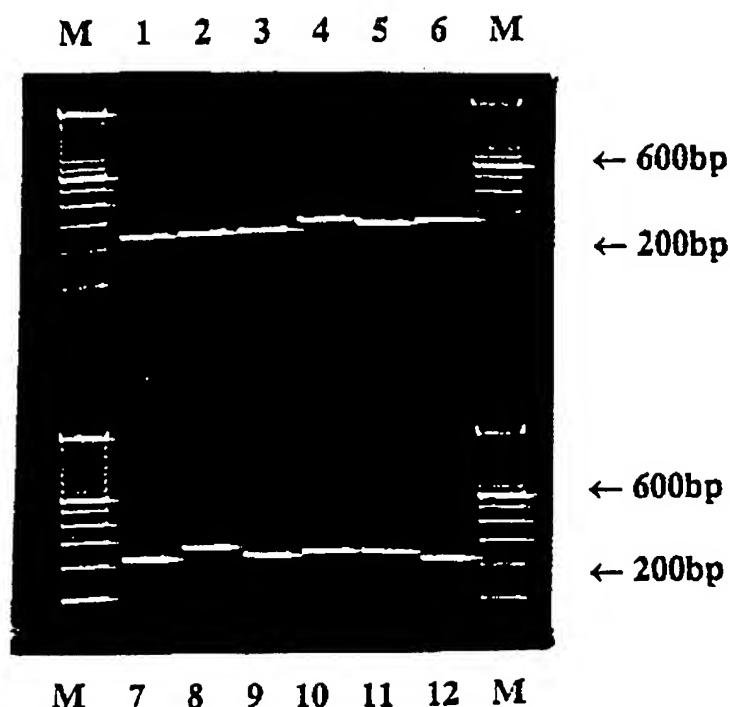
BEST AVAILABLE COPY

FIG 2



BEST AVAILABLE COPY

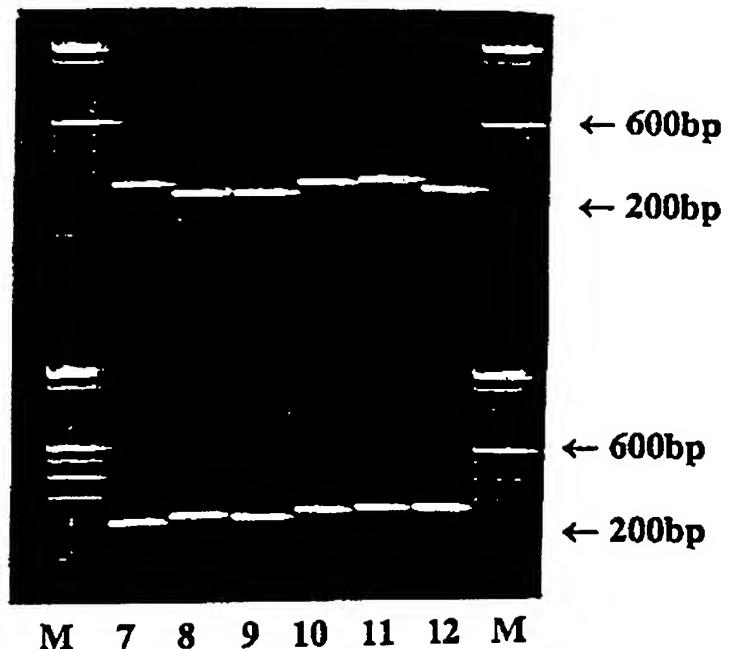
FIG 3



BEST AVAILABLE COPY

FIG 4

M 1 2 3 4 5 6 M



M 7 8 9 10 11 12 M

FIG 5

BEST AVAILABLE COPY

